

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 1 9 9 9 年 7 月 2 3 日
Date of Application:

出 願 番 号 平成 1 1 年 特 許 願 第 2 1 0 0 0 2 号
Application Number:

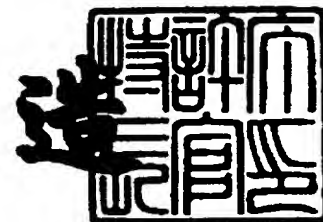
出 願 人 寒 川 賢 治
Applicant (s):

Best Available Copy

2 0 0 1 年 2 月 2 0 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



【提出日】平成11年 7月23日

【あて先】特許庁長官 殿

【国際特許分類】

C07K 14/60

C12N 15/16

【発明者】

【住所又は居所】大阪府箕面市小野原東6丁目28、4-201号

【氏名】寒川 賢治

【発明者】

【住所又は居所】大阪府豊中市西緑丘1丁目5-1、302号

【氏名】児島 将康

【発明者】

【住所又は居所】大阪府箕面市西宿2丁目12-12、藤和箕面ホームズA808号

【氏名】細田 洋司

【発明者】

【住所又は居所】兵庫県神戸市東灘区西岡本6丁目4-24, 204号

【氏名】松尾 壽之

【特許出願人】

【住所又は居所】大阪府箕面市小野原東6丁目28、4-201号

【氏名又は名称】寒川 賢治

【代理人】

【識別番号】100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】岩谷 龍

【電話番号】06-4796-1300

【手数料の表示】

【納付金額】 21,000

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項2】 配列番号1記載のアミノ酸配列を有する請求項1記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項3】 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のN末端からi番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する請求項1記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項4】 配列番号3記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のN末端からi番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する請求項1記載のペプチド類縁体又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩。

【請求項5】 配列番号4記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のN末端から28番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する請求項3記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物。

【請求項6】 配列番号5記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のN末端から28番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する請求項4記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物。

【請求項7】 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項8】 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有し、少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸

される塩。

【請求項 9】 配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する請求項 7 乃至 8 記載のペプチド系化合物又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩。

【請求項 10】 配列番号 2 記載のアミノ酸配列、又は当該配列中の N 末端から i 番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する請求項 7 乃至 8 記載のペプチド系化合物又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩。

【請求項 11】 配列番号 3 記載のアミノ酸配列、又は当該配列中の N 末端から i 番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する請求項 7 乃至 8 記載のペプチド系化合物又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩。

【請求項 12】 配列番号 4 記載のアミノ酸配列、又は当該配列中の N 末端から 28 番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する請求項 10 記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物。

【請求項 13】 配列番号 5 記載のアミノ酸配列、又は当該配列中の N 末端から 28 番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する請求項 11 記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物。

【請求項 14】 修飾されたアミノ酸が N 末端から 3 番目アミノ酸である請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 15】 修飾されたアミノ酸におけるアミノ酸がセリン又はシステインであることを特徴とする請求項 14 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 16】 修飾アミノ酸における修飾が、アミノ酸の α 炭素において、(1) 炭素数 1 以上のアルキル鎖を介して又は介さず、エステル、エーテル、

チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から選択される和口様式で結合する炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(2) H又は炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を示す請求項1乃至6記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項17】 エステル結合により修飾された修飾アミノ酸を有する請求項1記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項18】 脂肪酸が結合したアミノ酸を有する請求項17記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項19】 炭素数が2乃至35である脂肪酸が結合したアミノ酸を有する請求項18記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項20】 結合した脂肪酸がカプリル酸 (caprylic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求項18記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項21】 結合した脂肪酸がカプリン酸 (capric acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求項18記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項22】 結合した脂肪酸がラウリン酸 (lauric acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求項18記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項23】 N末端が炭素数1以上の飽和あるいは不飽和アルキル又はアシル基により修飾され及び／又はC末端がOZ又はNR₂R₃ (Zは薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基、R₂及びR₃はH及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す) により修飾されたことを特徴とする請求項1乃至22項記載のペプチド系化合物。

【請求項24】 請求項1乃至6記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物。

【請求項25】 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療

含有することからなる当該疾患を治療するための医薬組成物。

【請求項 26】 ヒト以外の動物に適用するための請求項 24 乃至 25 記載の医薬組成物。

【請求項 27】 請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法。

【請求項 28】 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる当該疾患の治療方法。

【請求項 29】 ヒト以外の動物に適用するための請求項 27 乃至 28 記載の治療方法。

【請求項 30】 請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物に係る DNA であって、当該 DNA 配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする DNA 配列を有する当該 DNA。

【請求項 31】 配列番号 6 記載の DNA 配列を有する請求項 30 記載の c DNA (NCR 含む)

【請求項 32】 配列番号 6 記載の DNA 配列における 31 番目から 381 番目までの DNA 配列を有する請求項 30 記載の c DNA (NCR 含まない)。

【請求項 33】 配列番号 7 記載の DNA 配列を有する請求項 30 記載の c DNA (NCR 含む)。

【請求項 34】 配列番号 7 記載の DNA 配列における 34 番目から 385 番目までの DNA 配列を有する請求項 30 記載の c DNA (NCR 含まない)。

【請求項 35】 請求項 30 乃至 34 記載の DNA を有するベクター。

【請求項 36】 請求項 35 記載のベクターを含有する細胞。

【請求項 37】 請求項 30 乃至 34 記載の DNA を有するベクターを有し、且つ当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチド系化合物として産生することができる細胞。

プチド系化合物を同定することを特徴とする当該ペプチド系化合物のアッセイ方法。

【請求項 40】 請求項 38 記載の抗体を用いて請求項 1 乃至 23 記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする当該ペプチド系化合物の検出用キット。

【請求項 41】 請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、請求項 30 記載の DNA を含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる当該方法。

【請求項 42】 請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、請求項 30 記載の DNA を含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする当該方法。

【請求項 43】 請求項 18 乃至 22 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、配列番号 1 記載のアミノ酸配列中のセリン残基に脂肪酸が結合したペプチドとして産生することができる細胞を用いることを特徴とする製造方法。

【請求項 44】 請求項 7 乃至 13 記載のペプチド系化合物をコードする DNA を含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取することを特徴とする、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチド系化合物の製造方法。

【請求項 45】 請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物をコードする DNA を含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療す

【請求項 4 6】 請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物をコードする DNA

を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有することをペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法。

【請求項 4 7】 請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物をコードする DNA を含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物。

【請求項 4 8】 請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物をコードする DNA を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有することをペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明を詳細に説明するに先立ち、用語を以下のように定義する。ペプチドとは、複数のアミノ酸がペプチド結合で連なった直鎖状の化合物のことをいう。ここでアミノ酸とは、アミノ酸の一般式； $\text{NH}_2\text{-CH(R')-COOH}$ において、 R' が天然に存在する置換基を有する天然アミノ酸、当該置換基がさらに修飾された修飾アミノ酸及びその D、L-光学異性体ばかりではなく、例えば上記一般式において、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドを介して様々な置換基が結合した非天然アミノ酸も含む。ペプチド類縁体とは、ペプチドにおいて少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物で置換された化合物のことをいい、従って当該置換化合物のペプチド類縁体への少なくともひとつの結合は

チド類縁体及びそれらの誘導体を総称してペプチド系化合物とした。

【0002】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ペプチド中のアミノ酸が修飾されていることを特徴とした、細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用あるいは成長ホルモンの分泌誘導活性を有する新規ペプチドに関する。本願発明はまた、当該新規ペプチドの取得方法及び製造方法、該ペプチド及び該ペプチドの前駆体をコードする遺伝子、及び当該遺伝子を用いた該ペプチドの製造方法に関する。さらに本願発明は、本願発明により開示された新規修飾ペプチドの構造類似体で、成長ホルモン分泌誘導化合物のレセプターに結合して細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用あるいは成長ホルモンの分泌誘導活性を有するペプチド類縁体及びその製造方法に関する。本願発明はまた、該ペプチド及び該ペプチド類縁体を有効成分とする医薬用組成物、動物用成長促進剤、及び該ペプチドの抗体及びその利用方法に関する。

【0003】

【従来の技術】

成長ホルモン (growth hormone、以下単にGHと略称する) は、下垂体前葉で合成されるタンパク質ホルモンで、骨の成長及び脂肪細胞や軟骨細胞の分化を間接的に促進し、その分泌は、成長ホルモン放出ホルモン (GHRH; growth hormone-releasing hormone) で促進され、ソマトスタチン (somatostatin) で阻害される [J. Kendrew, et al., Eds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p.462]。GHは単に成長を促すだけではなく、各種組織でのタンパク質合成の促進、貯蔵脂肪の移動の刺激及び筋肉中のグリコーゲン含量の上昇などの作用もあり、GH分泌の低下は小人症を、過剰分泌は巨人症又は末端肥大症を惹起する [八杉龍一ら編, 岩波生物学辞典第4版 (岩波書店, 東京, 1997), 757頁]。

【0004】

ヒトGHが遺伝子組換え技術によって生産されるようになって以来、GHは上記小

の疾患の治療にも用いられ、様々な効果が見いだされた [J. O. Jorgensen, et al., Horm. Res. 42, 235 (1994)]。例えば、正常人での骨芽細胞及び骨再構成の活性化 [K. Brixen, et al., Miner. Res. 5, 609 (1990)]、GH欠乏症成人での筋肉量及び筋力の増強 [R. C. Cuneo, et al., J. Appl. Physiol. 70, 688 (1991)]、GH欠乏症成人での運動能力の向上 [R. C. Cuneo, et al., J. Appl. Physiol. 70, 695 (1991)]、小児の重度火傷治癒 [D. N. Herndon, et al., Ann. Surg. 212, 424 (1990)]、排卵誘発におけるゴナドトロピンとの併用 [R. Homburg, et al., Clin. Endocrinol. (Oxf). 32, 781 (1990)]、プレドニゾン投与によるタンパク質代謝異常の予防 [F. F. Horber and M. W. Haymond, J. Clin. Invest. 86, 265 (1990)]、重度免疫不全症におけるT細胞「教育」の促進 [W. J. Murphy, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 4481 (1992)]、老人性の体重減少、脂肪組織拡大及び皮膚萎縮を抑制する効果 [D. Rudman, et al., N. Engl. J. Med. 323, 1 (1990)] などがある。

【0005】

小児の成長促進、及び成人のGH欠乏に伴う代謝や機能の欠損の正常化に、組換えGHの投与は効果的ではあるが、用量限定的な副作用があること、経口投与ができないこと及びコスト面で問題がある [B. A. Lefker, et al., in Growth Hormon Secretagogues in Clinical Practoce, B. B. Bercu and R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998), p.107-p.108]。多くの成人患者は、過剰なナトリウムと体液の貯留によると思われる関節痛や手根管症候群のような副作用のため、GH投与を継続することができない [E. Corpas, et al., Endocr. Rev. 14, 20 (1993)]。これらの副作用は、GH投与によるホルモン分泌の非生理的なパターンと関係しており、GHの投与では正常なGH分泌の拍動性 (pulsatility) をまねることができない [B. A. Lefker, et al., in Growth Hormon Secretagogues in Clinical Practoce, B. B. Bercu and R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998), p.107-p.108]。

【0006】

生体内でのGH分泌の拍動性は、基本的には視床下部由来の2つの制御因子の相

【0007】

上に記載したGH投与に伴う副作用を克服するために、GH分泌誘導活性を有する化合物が数多く合成され、GH分泌誘導物質 (GHS; growth hormone secretagogue) としてその構造活性相関、薬理学、臨床応用が精力的に研究された。まず、GHRP-6 (Growth Hormone-Releasing hexapeptide) などのペプチドが合成され、GHの欠損ないしは低下に起因する治療薬として開発された [C. Y. Bowers, et al., Endocrinology 114, 1537-1545 (1984)]。しかし、これらのペプチド化合物は静脈注射でしか効果を発揮できないので、経口投与可能な低分子量の非ペプチド系化合物が開発され [R. G. Smith, et al., Science 260, 1640-1643 (1993)]、第二相臨床試験の段階にまで進んでいるものもある [A. A. Patchett, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 7001-7005 (1995)]。

【0008】

細胞における、レセプターのシグナル受容から機能発現に至るまでの一連の情報伝達をシグナル伝達 (signal transduction) というが、Gタンパク質と共役したシグナル伝達系は以下のような機構で進行する [八杉龍一ら編, 岩波生物学辞典第4版 (岩波書店, 東京, 1997), 555-556頁]。このGタンパク質共役系は細胞膜7回貫通型レセプターをもち、cAMPをセカンドメッセンジャーとして産生するcAMP系とイノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP3) やジアシルグリセロール (DG) イノシトールリン脂質情報伝達系に分けられる。cAMPはcAMP依存性のキナーゼ (Aキナーゼ) を活性化し、機能タンパク質のセリンやスレオニン残基のリン酸化を起こし、活性を修飾する。一方、IP3は小胞体上のIP3受容体と結合し、カルシ

を促す。

【0009】

IP3やDGをセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達系で、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する機構は以下の如くである [J. Kendrew, et al., Eds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p.136-137]。レセプターヘリガンドが結合すると、Gタンパク質を介してホスホリパーゼCが活性化されて、PIP2からIP3が生成する。IP3は細胞内顆粒であるERなどの小胞体に貯蔵されているカルシウムイオンを細胞質に放出させ、細胞質中のカルシウムイオン濃度が上昇する。IP3もしくはカルシウムイオンがさらに細胞質に存在すると、カルシウムは再び小胞体に取り込まれ、細胞質中のカルシウムイオン濃度は低下する。すなわち、レセプターへのリガンドの結合は、細胞質中のカルシウムイオン濃度の一過性の上昇をもたらす。

【0010】

GHSはGHRHによるGHの分泌及び細胞内cAMPレベルの上昇に協奏的に作用すること [K. Cheng, et al., Endocrinology 124, 2791-2798 (1989)]、及びGHRHのレセプターへの結合はcAMPをセカンドメッセンジャーとして産生するのに対して、GHSは細胞内カルシウムイオン濃度の上昇をもたらすことから、GHSの作用機作はGHRHのそれとは異なることが示唆され [J. Herrington and B. Hille, Endocrinology 135, 1100-1108 (1994).]、GHSはGHRHが結合するGHRHレセプターとは異なるレセプターに結合することが想定された。実際にGHSが結合するレセプター遺伝子がクローニングされ、ノザン解析の結果からGHSレセプター (GHS-R) は視床下部及び脳下垂体で発現していること、及びブタとヒト由来のGHS-Rのアミノ酸配列が90%以上の同一性を示すことがわかった [A. D. Howard, et al., Science 273, 974-977 (1996)]。しかし、GHS-Rに結合する内在性のリガンドは単離されておらず、このGHS-Rはリガンドが不明なオーファン・レセプターであった。

【0011】

タンパク質のアミノ末端、又はタンパク質を構成するアミノ酸残基の側鎖に、

口することがあるが、これらの脂肪酸の役割はこれらの脂肪酸修飾タンパク質を細胞膜にアンカーリング (anchoring) することにある [J. Kendrew, et al., E ds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p. 616]。これらの脂肪酸修飾タンパク質において、脂肪酸はシステイン残基にS-アシル結合で結合しており、本願発明によって開示された内在性のGHSのようにセリン残基にO-アシル結合で脂肪酸が結合したアミノ酸、この脂肪酸修飾アミノ酸を含むタンパク質及びペプチドは全く知られていなかった。また、脂肪酸で修飾されたアミノ酸を含むペプチドが、いかなるレセプターのリガンドとして機能することも知られていなかった。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

GHSレセプターに結合して細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるか、又はGH分泌を誘導する活性を有する内在性のリガンド、すなわち内在性GHSの発見及び利用方法が所望されていた。さらに、当該内在性GHSの構造類似体で、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるか、又はGH分泌誘導活性を有する化合物が望まれていた。また、当該内在性GHS又はその構造類似化合物を含有し、GHの拍動的な分泌を誘導することによってGH投与による副作用のない医薬組成物あるいは動物の成長を促進するための組成物、及び当該組成物を用いた治療方法が所望されていた。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、GHSレセプター (GHS-R) へのリガンドの結合がイノシトールリン脂質をセカンドメッセンジャーとして細胞内カルシウムイオン濃度の一過性の上昇をもたらすことに着目し、GHS-Rを発現させたCHO細胞 (CHO-GHSR62) において細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性 (Ca上昇活性) を指標に、各種臓器又は組織の抽出物をスクリーニングした。その結果、ラット胃の抽出物に強いCa上昇活性があることを見だし、当該抽出物より各種クロマトグラフィーを用いてCa上昇活性を有する物質を精製して、該物質が脂肪酸で修飾された分子

、下垂体前葉細胞からのGHの特異的な分泌を促進することを確認して、該新規ペプチドがGHS-Rの内在性のリガンド、すなわち内在性GH分泌誘導物質（内在性GHS）であることを見出した。すなわち、本願発明の第一は、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性又はGH分泌誘導活性を有し、構成アミノ酸残基が脂肪酸で修飾されたいることを特徴とする内在性のGH分泌誘導ペプチド、及び該ペプチドの取得方法である。

【 0 0 1 4 】

本願発明者らは、該内在性GH分泌誘導ペプチドの構造を詳細に解析し、該ペプチドが配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであり、アミノ末端から3番目のセリン側鎖の水酸基が脂肪酸でアシル化されていることを見出した。またラットと同様、強いCa上昇活性が存在するヒト胃抽出物中からも、ラット由来のGH分泌誘導ペプチドと同様の方法で精製及び構造解析を行った結果、ヒト由来の内在性GH分泌誘導ペプチドも配列番号3に記載のアミノ酸配列からなり、アミノ末端から3番目のセリン側鎖の水酸基が脂肪酸でアシル化されていることがわかった。ラット及びヒト由来の内在性GH分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列を比較すると全体で89%の高い同一性を示した。特にアミノ末端から10番目までのアミノ酸配列は同一であり、11番目のアミノ酸もラットでアルギニン、ヒトでリジンであった。ラット由来の内在性GH分泌誘導ペプチドを各種プロテアーゼで切断し、精製したペプチド断片のCa上昇活性を測定した結果、アミノ末端から7番目までのアミノ酸配列からなるペプチドがCa上昇活性を有する最小のペプチドであった。以上の結果から、内在性GH分泌誘導ペプチドにおいてCa上昇活性発現に必須の領域は、配列番号1に記載のアミノ末端から7番目のアミノ酸までであることがわかった。すなわち、本願発明の第2は、配列番号1に記載のアミノ酸配列をCa上昇活性発現に必須のコア配列として含む脂肪酸修飾ペプチドである。

【 0 0 1 5 】

本願発明によって開示されたGH分泌誘導活性をもつ内在性脂肪酸修飾ペプチド又は上記コア配列からなる脂肪酸修飾ペプチドは、Ca上昇活性を有する化合物の設計指針も提供する。すなわち、当該脂肪酸修飾ペプチドの構造類似化合物を合

【0016】

内在性GH分泌誘導ペプチドをコードするcDNAを常法により取得した。配列番号4及び5に記載したアミノ酸配列に示された如く、ラット及びヒトのcDNAはいずれも117アミノ酸からなり、アミノ末端から24番目ないし51番目まで28アミノ酸の配列がラット及びヒトの内在性GH分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列と各々一致した。すなわち、内在性GH分泌誘導ペプチドは117アミノ酸からなる前駆体ペプチドとして合成され、アミノ末端側の23アミノ酸からなるシグナルペプチドが切断を受け、さらにカルボキシル末端側の56アミノ酸が切断除去されてGH分泌誘導活性をもつ脂肪酸修飾ペプチドが生成することが明らかになった。従って、本願発明の第4は、内在性GH分泌誘導ペプチドの前駆体をコードするcDNA及び当該cDNAを用いたCa上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチド又はペプチド類縁体の原料となるペプチドの製造方法である。

【0017】

本願発明で開示されたCa上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチド又はCa上昇活性を有するペプチド類縁体は、GHの欠損又は低下に起因する疾患を治療するための医薬組成物も提供する。該医薬組成物はGHの投与が有効である全ての疾患に用いることができ、GHの投与によって生じる様々な副作用を克服することができる。また、該医薬組成物は動物の成長促進剤などの動物用薬剤としても用いることができる。

【0018】

本願発明で開示されたCa上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを抗原として調製された抗体、当該抗体を用いた内在性GH分泌誘導ペプチドの測定方法、及び該抗体を具備した測定キットも本願発明に属する。

すなわち本願発明は、アシル化セリンという新規修飾アミノ酸を有する新規ペ

脂肪酸修飾ペプチド、GH放出ホルモン及びソマトスタチンによるGH分泌誘導機構の解明は、単にGH分泌誘導機構に限らず他のホルモン分泌制御機構にも敷衍することが示唆される。本願発明は、脂肪酸修飾ペプチドの循環器系および代謝系の制御因子としての多様な機能を開示するものであり、本願発明の効果は新しい生体制御機構の解明にも及ぶものである。

【 0 0 1 8 】

具体的には本願発明は

- (1) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、
- (2) 配列番号1記載のアミノ酸配列を有する前記(1)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、
- (3) 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のN末端からi番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記(1)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、
- (4) 配列番号3記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のN末端からi番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記(1)記載のペプチド類縁体又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、
- (5) 配列番号4記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のN末端から28番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記(3)記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物、
- (6) 配列番号5記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のN末端から28番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記(4)記載のペプチド系

(7) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(8) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有し、少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換された前記(7)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(9) 配列番号1記載のアミノ酸配列を有する前記(7)乃至(8)記載のペプチド系化合物又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、

(10) 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のN末端から*i*番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記(7)乃至(8)記載のペプチド系化合物又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、

(11) 配列番号3記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のN末端から*i*番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記(7)乃至(8)記載のペプチド系化合物又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、

(12) 配列番号4記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のN末端から28番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記(10)記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物、

(13) 配列番号5記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のN末端から28番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記(11)記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物、

(14) 修飾されたアミノ酸がN末端から3番目アミノ酸である前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(15) 修飾されたアミノ酸におけるアミノ酸がセリン又はシステインであることを特徴とする前記(14)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容さ

(16) 修飾アミノ酸における修飾が、アミノ酸の α 炭素において、(1)炭素数1以上のアルキル鎖を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から選択される結合様式で結合する炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(2)1-1又は炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を示す前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(17) エステル結合により修飾された修飾アミノ酸を有する前記(1)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(18) 脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記(17)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(19) 炭素数が2乃至35である脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記(18)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(20) 結合した脂肪酸がカプリル酸(caprylic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(18)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(21) 結合した脂肪酸がカプリン酸(capric acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(18)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(22) 結合した脂肪酸がラウリン酸(lauric acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(18)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(23) N末端が炭素数1以上の飽和あるいは不飽和アルキル又はアシル基により修飾され及び／又はC末端がOZ又はNR₂R₃(Zは薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基、R₂及びR₃はH及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す)により修飾されたことを特徴とする前記(1)乃至(22)項記載のペプチド系化合物、

(24) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容

(25) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる当該疾患を治療するための医薬組成物、

(26) ヒト以外の動物に適用するための前記(24)乃至(25)記載の医薬組成物、

(27) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(28) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる当該疾患の治療方法、

(29) ヒト以外の動物に適用するための前記(27)乃至(28)記載の治療方法、

(30) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物に係るDNAであって、当該DNA配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードするDNA配列を有する当該DNA、

(31) 配列番号6記載のDNA配列を有する前記(30)記載のcDNA(NCR含む)、

(32) 配列番号6記載のDNA配列における31番目から381番目までのDNA配列を有する前記(30)記載のcDNA(NCR含まない)、

(33) 配列番号7記載のDNA配列を有する前記(30)記載のcDNA(NCR含む)、

(34) 配列番号7記載のDNA配列における34番目から385番目までのDNA配列を有する前記(30)記載のcDNA(NCR含まない)、

(35) 前記(30)乃至(34)記載のDNAを有するベクター、

(36) 前記(35)記載のベクターを含有する細胞、

(37) 前記(30)乃至(34)記載のDNAを有するベクターを有し、且つ

酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチド系化合物として産生することができる細胞、

(38) 前記(1)乃至(23)記載のペプチド系化合物に対する抗体、

(39) 前記(38)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(23)記載のペプチド系化合物を同定することを特徴とする当該ペプチド系化合物のアッセイ方法、

(40) 前記(38)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(23)記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする当該ペプチド系化合物の検出用キット、

(41) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(30)記載のDNAを含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる当該方法、

(42) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(30)記載のDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする当該方法、

(43) 前記(18)乃至(22)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、配列番号1記載のアミノ酸配列中のセリン残基に脂肪酸が結合したペプチドとして産生することができる細胞を用いることを特徴とする製造方法、

(44) 前記(7)乃至(13)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取することを特徴とする、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチド系化合物の製造方法、

(45) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含

させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、

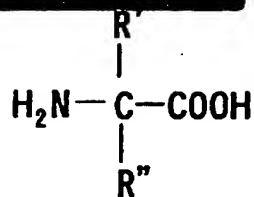
(46) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有することをペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(47) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含む有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、及び

(48) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有することをペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、に関する。

【0019】

なお、本発明において、アミノ酸とはL-アミノ酸、D-アミノ酸、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、天然アミノ酸、合成アミノ酸等あらゆるアミノ酸を含む。又、修飾アミノ酸とは上記アミノ酸の任意の基、特に α -アミノ酸における α 炭素が化学修飾されているアミノ酸を意味する。すなわち、修飾アミノ酸は、 α -アミノ酸を式

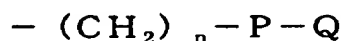


で表したとき、 R' 、 R'' はH又は任意の置換基でよくて、要するに天然アミノ酸を化学修飾したものならどのようなものでもよい。なお、 R' 、 R'' とのいずれか一方はHでもよい。 R' 、 R'' で示される置換基としては、天然のアミノ酸に存在する置換基を、天然のアミノ酸又はそれに対応するD-アミノ酸に存在しない置換分で置き換えたアミノ酸を修飾アミノ酸と称し、そのような置換分として、例えば天然に存在するアミノ酸が側鎖に $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH-$ 又は $-NH_2$ を含む場合、これらアシル化して形成される基が好適な例として挙げられる。

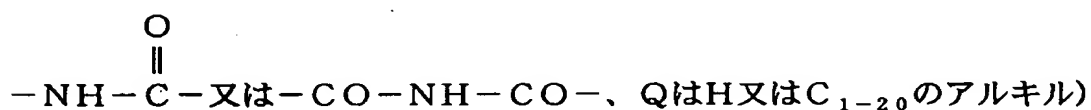
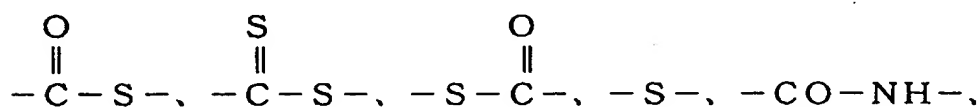
【0020】

そのためのアシル基としては段落番号〔0031〕に例示されている。又、さらに修飾アミノ酸は上記の R' 又は／及び R'' で示される基を例えば式

【化2】



(式中、 n は0～10の整数、 P は $\begin{array}{c} O \\ || \\ -C-O- \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} O \\ || \\ -O-C- \end{array}$ 、 $-O-$ 、



で置き換えたアミノ酸であってもよい。さらに P は $-CO-$ でもよい。

【0021】

【発明の実施の態様】

GHSレセプター(GHS-R)の内在性リガンドとなるペプチドについては、GHS-Rを発現している細胞に各種臓器又は組織の抽出物を添加し、細胞内カルシウムイ

知ることができる。GHS-Rを発現している細胞としては、恒常的にGHS-Rを発現していることが知られている視床下部及び脳下垂体、及びそれらの組織由来の細胞株があるが、GHS-R遺伝子を適当な細胞、例えばCHO細胞に導入・発現させた形質転換細胞が望ましい。細胞内カルシウムイオン濃度の測定法は公知の方法が利用できるが、望ましくは、カルシウムイオン濃度変化によるFluo-4 AM (Molecular Probe社) の蛍光強度の変化を利用したFLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices社) がよい。本願発明の内在性GHSペプチドにおいては、該ペプチドが発現している視床下部及び脳下垂体ではなく、消化器系の臓器である胃の抽出物に強いCa上昇活性が認められた。従って、目的のオーファン・レセプターの内在性リガンドを見いだすためには、該レセプターが発現している組織・臓器ばかりではなく、他の組織・臓器も広く探索することが必要である。

【0022】

Ca上昇活性が確認された組織・臓器の抽出物から、目的の内在性GHSペプチドを生成するためには、公知の精製方法を用いることができる。ペプチドの精製法としては、各種分画法による分画後、ゲル濾過、イオン交換及び逆相クロマトグラフィーを、単独又は組み合わせて用いるが有効であるが、必ずしも該クロマトグラフィーによる精製にこだわる必要はなく、ペプチドの精製に有効である手段は何でも利用可能である。また、組織・臓器よりペプチドを単離・精製する際には、組織・臓器に存在するプロテアーゼの作用による目的ペプチドの分解を防止するために、組織・臓器を沸騰水中で熱処理することによりプロテアーゼを失活させることが望ましい。熱処理し組織・臓器を氷冷除去することも、目的ペプチドの抽出・精製に効果がある。

【0023】

精製されたCa上昇活性を有するペプチドが、in vitro 及びin vivoでGH分泌誘導活性を確認するためには、公知の方法を利用することができる。例えばin vitroでは、GHを分泌してGHS-Rの発現も確認されている脳下垂体細胞に添加して、細胞培養液中に分泌されるGHを、抗GH抗体を用いたラジオイムノアッセイによって測定することができる。また上記ラジオイムノアッセイ法において、抗GH抗体

さる。In vivoでのGH分泌誘導活性を確認するためには、Ca上昇活性を有するペプチドを動物の末梢静脈に注射した後の血清中のGH濃度を測定すればよい。

【0024】

精製されたペプチドの構造解析には、公知の方法が使用可能である。ペプチドのアミノ酸配列を決定するためには、エドマン分解法によりカルボキシル末端より逐次アミノ酸残基を遊離して、該遊離アミノ酸を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によってアミノ酸を同定する方法、及び該方法を自動化したアミノ酸シーケンサーによる方法がある。また、GC-MASSによってイオン化したフラグメントの分子量を測定することにより、アミノ酸配列を決定する方法もある。本願発明の1つである修飾アミノ酸を含有するペプチドの場合は、上記アミノ酸配列を決定する際に修飾アミノ酸が「未知アミノ酸」と同定される。この場合、当該修飾ペプチドをアミノ酸単位に分解後、修飾アミノ酸を分離・精製して、常用される化合物構造決定法によって修飾アミノ酸を構造決定し、ペプチド全体の構造を知ることができる。また、修飾ペプチドをコードするcDNAから得られる該ペプチドのアミノ酸配列を有するペプチドを化学合成し、当該合成非修飾ペプチドと修飾ペプチドの分子量や物性等から修飾基の構造を推定する方法もある。

【0025】

構造決定されたペプチド中での、Ca上昇活性に必要な部分のアミノ酸配列（コア配列）は、該ペプチドをプロテアーゼで切断して生成するペプチド断片のCa上昇活性を測定することによって明らかにされる。用いられるプロテアーゼは、切断するペプチドのアミノ酸配列に特異性の高いプロテアーゼを用いてよいが、特異性が低くても部分分解の条件で反応させることにより該ペプチドから様々なペプチド断片が調製できる。このようにして調製されたペプチド断片のCa上昇活性を測定することにより、Ca上昇活性に必須のコア配列を知ることができる。また、脊椎動物におけるGH分泌誘導活性を有するペプチドのアミノ酸配列を比較することにより、脊椎動物で広く保存されている領域を見だし、該領域のアミノ酸配列からGH分泌誘導活性に必須のコア配列を見いだすことができる。

【0026】

内在性GH分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列から推定される塩基配列を持つDNAを化学合成し、該DNAをプローブとして該ペプチドが発現している細胞のmRNAから作製したcDNAライブラリーをスクリーニングして、当該ペプチドをコードするcDNAを取得することができる。しかし、アミノ酸に対応するコドンは縮重しており、ペプチドのアミノ酸配列から推定される塩基配列が多くなり、このような多種類の塩基配列からなる合成DNAをプローブとしたスクリーニングが困難になることがある。そのような場合で、当該ペプチドのアミノ酸配列と一致する配列が、配列データベースにおいて公開された発現DNA断片（EST; Expressed Sequence Tag）の塩基配列から想定されるアミノ酸配列にある場合は、該ESTの塩基配列の一部からなるDNAを合成して、上記cDNAライブラリーのスクリーニングに用いることもできる。また、cDNAからゲノムDNAを取得することは、常用される方法で行うことができる。

【0027】

このようにして取得されたcDNAの塩基配列から、内在性GH分泌誘導ペプチドの前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列が明らかにされる。当該アミノ酸配列を解析することにより、シグナルペプチド、内在性GH分泌誘導ペプチド及びその他のペプチド部分、及びこれらのペプチドの切断点が明らかになり、内在性GH分泌誘導ペプチドの生成機構が明らかになる。なお、本願発明の1つである内在性GH分泌誘導ペプチドの一部のアミノ酸配列、当該ペプチドの前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列及び該ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列が、国際出願公開W0 98/42840において開示されているが、該出願で開示されたペプチドはモチリン（motilin）様活性を有する14アミノ酸からなるペプチドであり、本願発明で開示されたCa濃度上昇活性やGH分泌誘導活性については記載がない。

【0028】

本願発明に係るペプチド系化合物とは、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、次式（1）で示される構造において、少なくとも1つアミノ酸が修飾アミノ酸で置換されているペプチド、又は少なくとも1つのアミノ酸が非アミノ酸で置換されたペプチド類縁体、及びそれらのアミノ末端及び/又はカルボキシル末端が修飾されたペプチド誘導体をいう。本発明において、上記のペ

た、当該ペプチド系化合物において、複数のアミノ酸が修飾アミノ酸および非アミノ酸で置換されてもよい。

【0029】

本発明のペプチド系化合物は好ましくは細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び生体内で成長ホルモンの分泌を誘導するペプチドであって、少なくとも一つのアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換された化合物である。すなわち、本発明におけるペプチド系化合物は、細胞内カルシウムイオン濃度上昇活性又は／及び生体内成長ホルモン分泌誘導作用を有し、ペプチド鎖においてアミノ酸が修飾アミノ酸又は／及び非アミノ酸化合物で置換されたペプチド系化合物である。

【0030】

そのような化合物の具体例として配列番号1、2又は3が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物、配列番号4又は5が示すペプチドにおいて第25番目アミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

【0031】

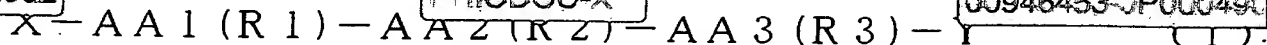
本発明におけるアシル化によって水酸基に導入されるアシル基は例えば有機カルボン酸、有機スルホン酸、有機リン酸化合物から水酸基を除去して形成される基である。有機カルボン酸としてはより具体的には、脂肪酸が挙げられ、その炭素数は好ましくは2～35（より好ましくは6～18、最も好ましくは8～12）である。そのような脂肪酸としては、具体的には、カプリル酸、カプリン酸、ラウリル酸、それらのモノエン又はポリエン脂肪酸等が挙げられる。

【0032】

第3番目のSerの水酸基がアシル化されている配列番号1のアミノ酸配列を含む、いかなるペプチド系化合物又はその薬理学的に許容される塩も本発明における好ましい実施の態様である。

【0033】

さらに又、本発明の好ましい実施の態様は下記一般式（1）で表される化合物



(式中、Xは、アミノ末端のアミノ酸の α -アミノ基の水素原子に相当する部分で、H又は炭素数が1又は複数の飽和又は不飽和アルキル又はアシル基が例示される。AA1はアミノ酸又はジペプチドを、AA2はアミノ酸、又は $-CH_2-CH(R4)-CO-$ もしくは $-CH_2-CH(R5)-CH_2-$ を示し、AA3はアミノ酸又はペプチド鎖を示す。R1、R2およびR3はアミノ酸の側鎖に相当する部分であって、アミノ酸の α 位炭素に結合したH又は置換基である。R1、R2又はR3の具体例としては、

(1) 炭素数1以上のアルキル鎖を介し又は介せず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミノ又はカルバミドからなる群から選択される結合様式で結合する炭素数1以上の飽和もしくは不飽和アルキル鎖、

(2) H又は炭素数1以上の飽和もしくは不飽和アルキル鎖又は通常のアミノ酸の側鎖を示す。

この場合、アミノ酸の α 位炭素に結合した $-CO-$ と $-NH-$ 以外の二つの結合手は同一又は異なる上記置換基に結合していてもよいし、その二つの結合手のうち一つが上記置換基に結合していて他の一つがHに結合していてもよい。

なお、AA1がジペプチドであるときその二つの置換基R1は同一であってもよいし異なってもよく、Yはカルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基の水酸基に相当する部分で、OH、OZ又はNR6R7であって、Zは薬理学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基、R4又はR5はH又は低級の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基で、R6とR7とは同一又は異なってもよい。]

【0034】

Xで示される炭素数が1以上の飽和又は不飽和アルキルとしては具体的にはメチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、t-ブチル、n-ヘプチル、n-ヘキシル、n-デシル、ビニル、プロパニル、ヘキセニル等の C_{1-20} のアルキルが好ましい。

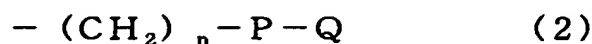
Xで示されるアシルとしては、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ベンゾイル等の C_{1-10} カルボン酸アシル、ベンゼンスルホニル、ナフタレンスルホニル

R4又はR5で示される基は、R1、R2又はR3で示される基と同意義であってよい。

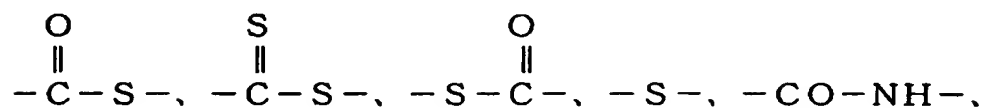
【0035】

R1、R2又はR3で示される基(1)は例えば式(2)

【化3】



(式中、nは0～10の整数、Pは $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ 、 $-\text{O}-$ 、



$-\text{NH}-\text{CO}-$ 又は $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-$ 、QはH又は上記したXで

示される C_{1-20} のアルキルであってもよい。)

で示される基が好ましい。さらにPは $-\text{CO}-$ でもよい。

【0036】

R1、R2又はR3で示される基(2)のアルキル鎖はXで示されるアルキル基と同意義であってよい。R1、R2又はR3で示される基(3)の通常のアミノ酸の側鎖は、天然のアミノ酸の側鎖であってよい。

Z、R6又はR7で示される低級アルキル基としては例えばメチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、t-ブチル、i-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル等の C_{1-6} のアルキルが好ましい。

【0037】

次に、本願発明に係るペプチド化合物の好ましい態様を以下に示す。

(1) AA1の好ましい態様；(ア) アミノ酸又はペプチド。例えば、Ser、Gly-Ser又は $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CO}-$ (2アミノ酸残基間のペプチド結合部分が $-(\text{CH}_2)_2-$ である場合)等が挙げられる。(イ) 一級アミン。例えば、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2-$ (2アミノ酸残基間のペプチド結合部分が $-(\text{CH}_2)_2-$ である場合)、 $-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2-$ (2アミノ酸残基間のペプチド結合部分が $-(\text{CH}_2)_2-$ である場合)、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{R1})\text{CH}_2-$ (2アミノ酸残基に相当)等が挙げられる。

【0038】
(2) AA2の好ましい態様；(ア) アミノ酸。例えば、Ser、homoser、lys、homocys、Asp、Glu、Lys、Ala、Val、Leu、homoleu、ile、homolle、オルニチン、アミノアジピン酸等が挙げられるが、特にSerが好ましい。(イ) アミノ酸残基以外の構造； $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}_1)-\text{CO}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}_1)-\text{CH}_2-$ 等が挙げられる(R1、R2は前記と同意義でよい)。

【0039】

(3) AA3の好ましい態様；アミノ酸又はペプチド。例えば、Phe又は配列番号2又は3記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から4番目のPheから28番目のArgまでのアミノ酸配列を有するペプチド若しくは当該配列のカルボキシル末端側のアミノ酸が、アミノ末端から5番目のLeuまで1つつつ欠失したペプチド。例えば

Phe Leu

Phe Leu Ser

Phe Leu Ser Pro

Phe Leu Ser Pro Glu

Phe Leu Ser Pro Glu His

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pr

Pro

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pr

Pro Ala

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pr

Pro Ala Lys

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pr

Pro Ala Lys Leu

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pr

Pro Ala Lys Leu Gln

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pr

Pro Ala Lys Leu Gln Pro

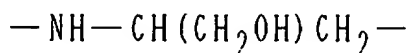
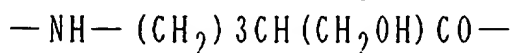
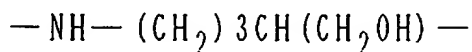
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pr

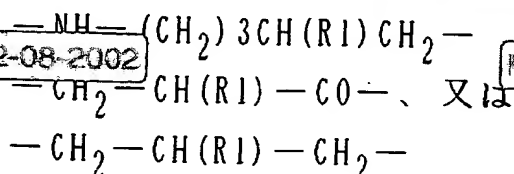
Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

がAA3の例として挙げられる。

【0040】

又さらに、AA3の例示において、アミノ酸はL-アミノ酸でもD-アミノ酸でもよいことはいうまでもない。又、AA3の上記例示において、例えば1～数個のアミノ酸（好ましくはアミノ酸配列の約3分の1程度まで）は非アミノ酸単位、例えば





で置き換えられてもよい(上記式中R1は前記と同意義)。上記式で示される基がAA3に複数個あり、しかもR1で示される基が複数個ある時、それらは同一又は異なる。又、さらに、AA3の例示における各アミノ酸のいずれも上記R3で示される置換基を有してよい。AA3で示される基において、R3が複数個存在する時は、それらは同一であっても異なってもよい。

【0041】

(4) R1、R2又はR3の好ましい態様；アミノ酸残基の側鎖に相当する部分であって、アミノ酸残基の α 炭素に、(1)炭素数1以上のアルキル鎖を介し又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から選択される結合様式で結合する炭素数が1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(2)H又は直接結合する炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を示し、XはH又は炭素数が1以上の飽和あるいは不飽和アルキル若しくはアシル基であってよい。

なお、アルキル酸、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド、カルバミド、飽和・不飽和アルキル、アシルは前記と同様であってよい。

【0042】

以下にペプチドを構成するアミノ酸が側鎖に水酸基、メルカプト基、イミノ基又はアミノ基を有する場合の当該側鎖の好ましい例を示す。なお、以下のRは炭素数1以上の飽和又は不飽和アルキル鎖を示す。かかるアルキル鎖はXで示される上記のアルキル鎖と同意義でよい。

- ア) Serの側鎖； $\text{—CH}_2\text{—O—CO—R}$ 又は $\text{—CH}_2\text{—O—R}$ 、
- イ) homoSerの側鎖； $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—O—CO—R}$ 又は $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—O—R}$ 、
- ウ) Cysの側鎖； $\text{—CH}_2\text{—S—CO—R}$ 又は $\text{—CH}_2\text{—S—R}$ 、
- エ) homoCysの側鎖； $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—S—CO—R}$ 又は $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—S—R}$ 、
- オ) Aspの側鎖； $\text{—CH}_2\text{—CO—O—R}$ 、 $\text{—CH}_2\text{—CO—NH—R}$ 、
- カ) Gluの側鎖； $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CO—O—R}$ 、 $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CO—NH—R}$

キ、 $-(CH_2)_4-NH-CO-R$
ク) アミノアジピン酸の側鎖； $-CH_2-CH_2-CH_2-CO-O-R$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CO-NH-R$ 、
ケ) オルニチンの側鎖； $-(CH_2)_3-NH-CO-R$
コ) 側鎖がアルキル鎖のアミノ酸であるAla、Val、Leu、homoLeu、Ile、homolle
等についても同様にアルキル基が上記のように式(2)で示される修飾されたアル
キル基であってよい。

【0043】

又、さらに本発明は、配列番号2又は3のアミノ酸配列において、アミノ末端
から13、14又は15番目までのアミノ酸からなる部分ペプチドを含有する細胞内カル
シウムイオン濃度上昇剤もしくはGH分泌誘導剤も、好ましい実施の態様として
含むものである。この場合の部分ペプチドを構成する各アミノ酸単位は必ずしも
化学修飾されている必要はない。

上記製剤は、上記部分ペプチドを例えば下記する公知の賦形剤と混合する等自
体公知の製造方法によって容易に製造することができる。

【0044】

本発明に係るペプチド系化合物は常法により得ることができる。例えば、既に
上述のように天然の原料から単離されるか、又は組換えDNA技術及び／若くは化
学的合成によって製造することができる。更にアミノ酸残基に修飾(例えば、ア
シル化)が必要な場合は自体公知の手段に従って修飾反応を施す。

【0045】

本願発明に係るペプチドをコードするDNAを有する発現ベクターにより形質転
換された宿主細胞を培養し、当該培養物から目的のペプチドを採取することによ
り得られる。当該宿主細胞を選択することにより、当該細胞内において目的のペ
プチドにアシル化等の修飾がされた化合物を得ることができる。また、当該ペプ
チドが修飾されていない場合は、必要に応じて自体公知の手段に従ってアシル化
等の修飾反応を行う。アシル化反応にはリパーゼ等の酵素を用いることもできる
。

【0046】

遺伝子を組み込むベクターとしては、例えば大腸菌のベクター(pBR322、pUC1

ィルス等)等が挙げられるが、その他のものであっても、宿主細胞内で複製保持されるものであれば、いづれをも用いることができる。当該ベクターは、適当な宿主細胞に導入される。目的の遺伝子をプラスミドに組み込む方法や宿主細胞への導入方法としては、例えば、Molecular Cloninng (Sambrook et al., 1989)に記載された方法が利用できる。

【0047】

上記プラスミドにおいて目的のペプチド遺伝子を発現させるために、当該遺伝子の上流にはプロモーターを機能するように接続させる。本願発明において用いられるプロモーターとしては、目的遺伝子の発現に用いる宿主細胞に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する宿主細胞がEscherichia属の場合はlacプロモーター、trpプロモーター、lppプロモーター、λPLプロモーター、recAプロモーター等を用いることができ、Bacillus属の場合はSP01プロモーター、SP02プロモーター等を用いることができ、酵母の場合はGAPプロモーター、PH05プロモーター、ADHプロモーター等を用いることができ、動物細胞の場合は、SV40由来プロモーター、レトロウィルス由来プロモーター等を挙げることができる。

【0048】

上記のようにして得られた目的遺伝子を含むベクターを用いて宿主細胞を形質転換する。宿主細胞としては細菌(例えば、Escherichia属、Bacillus属等)、酵母(Saccharomyces属、Pichia属、Candida属等)、動物細胞(CHO細胞、COS細胞等)等を用いることができる。当該細胞中において目的ペプチドに修飾を行える細胞を用いることができる。培養時の培地としては液体培地が適当であり、当該培地中には培養する形質転換細胞の生育に必要な炭素源、窒素源等が含まれる。必要に応じてビタミン類、成長促進因子、血清などを添加する。

【0049】

脂肪酸修飾ペプチドを直接製造するためには、該ペプチドの前駆体ポリペプチドを適切な位置で切断できるプロセッシング・プロテアーゼ活性を有し、当該ペ

なプロセッシング・プロテアーゼ活性およびセリンアシル化活性を有する宿主細胞は、当該前駆体ポリペプチドをコードするcDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞がCa上昇活性又はGH分泌誘導活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを産生することを確認することにより、選抜できる。

【0050】

培養後、培養物から本発明に係るペプチドを常法により分離精製する。例えば、培養菌体又は細胞から目的物質を抽出するには、培養後、菌体又は細胞を集め、これをタンパク質変性剤（塩酸グアニジンなど）を含む緩衝液に懸濁し、超音波などにより菌体又は細胞を破砕した後、遠心分離を行う。次に上清から目的物質を精製するには、目的物質の分子量、溶解度、荷電（等電点）、親和性等を考慮して、ゲル濾過、限外濾過、透析、SDS-PAGE、各種クロマトグラフィーなどの分離精製方法を適宜組み合わせて行うことができる。

【0051】

本発明に係るペプチド化合物は常法により化学合成することができる。例えば、保護基の付いたアミノ酸を液双方及び／又は固相法により縮合、ペプチド鎖を延長させ、弗化水素で全保護基を除去し、得られた粗生成物を上記の精製方法で精製することにより得られる。アシル化酵素又はアシル基転移酵素で選択的に目的位置にあるアミノ酸の側鎖をアシル化することもできる。

【0052】

ペプチドの製造法は従来既に種々の方法が充分に確立されていて、本発明のペプチド系化合物の製造もそのような自体公知の方法に従って容易に製造できる。例えば古典的なペプチド合成法に従ってもよいし、固相法に従ってもよい。

以下に、組換えDNA技術と化学合成を併用した本発明に係るペプチド化合物の製法について例を挙げる

具体例：

N末端部ペプチドの活性エステル、例えば、（1）Boc-Gly-Ser(OBu)-Ser(R)-Osu、（2）Boc-Gly-Ser(OBu)-Ser(R)-Phe-Osu、又は（3）Boc-Gly-Ser(OBu)-Ser(R)-Phe-Leu-Osuを化学合成し、各々、組換えDNA技術により生産したC末端部

NH₂-SPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPRに変換する。この化合物と Boc-Gly-Ser(OBu)-Ser(R)-Osu を中性から弱アルカリ水溶液中で混合し、得られる BocGlySer(OBu)Ser(R)FLSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPR をトリフルオロ酢酸処理すれば目的物が得られる。上記アミノ酸の一文字標記は、1997年12月10日、株式会社ニュートンプレス発行の「細胞の分子生物学第3版」の記載に従った。

【0053】

本願発明のペプチド系化合物の塩としては薬学的に許容される塩が好ましく、例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例え

ナトリウム塩、カリウム塩が最も好ましい。

【0054】

本願発明のペプチド系化合物またはその薬理学的に許容しうる塩は毒性が低く、GH分泌誘導作用を有し、そのままもしくは自体公知の薬理学的に許容しうる担体、賦形剤、増量剤などと混合して哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル等）に対して用いることができる。投与量は成人に静脈注射する場合1日0.01～5mg/kgであり、好ましくは0.04～1.5mg/kgである。この量を1日1回～3回投与するのが望ましい。本願発明のペプチド系化合物は、薬学的に許容される担体と配合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの固形製剤；またはシロップ剤、注射剤などの液状製剤として経口または非経口的に投与することができる。

【0055】

薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。賦形剤の好適な例としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤の好適な例としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。結合剤の好適な例としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。崩壊剤の好適な例としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウムなどが挙げられる。溶剤の好適な例としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。溶解補助剤の好適な例としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール

などが挙げられる。懸濁化剤の好適な例としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン、などの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。等張化剤の好適な例としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。緩衝剤の好適な例としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。無痛化剤の好適な例としては、例えばベンジルアルコールなどが挙げられる。防腐剤の好適な例としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。抗酸化剤の好適な例としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

【0056】

上記医薬組成物は、GHの投与による効果と同等以上の効果をもたらし、GHの投与によって起こる様々な副作用も低減できる。当該医薬組成物の適用可能な疾患又はその効果は、GH欠損又は低下が関係するものとして、例えば、小人症、正常人での骨芽細胞及び骨再構成の活性化、GH欠乏症成人での筋肉量及び筋力の増強、GH欠乏症成人での運動能力の向上、小児の重度火傷治癒、排卵誘発におけるゴナドトロピンとの併用、プレドニゾン投与によるタンパク質代謝異常の予防、重度免疫不全症におけるT細胞「教育」の促進、老人性の体重減少、脂肪組織拡大及び皮膚萎縮を抑制する効果などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、GH欠損又は低下と直接関係しない疾患又は効果としては、例えば実施例7に記載したように、当該医薬組成物は拍動量の増加効果があるから、心不全等の心疾患の治療に効果がある。当該医薬組成物の効果はヒトには限らない。すなわち、動物の成長促進、食肉中の脂身の低減等、GH投与と同等以上の効

【0057】

本願発明によるCa上昇活性又はGH分泌誘導活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを抗原とする抗体は、公知の方法により取得できる。当該抗体は、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体のいずれでもよく、それらの取得についても公知の方法が利用できる。また、これらの抗体を用いた脂肪酸修飾ペプチドの測定方法および当該測定法を利用した測定キットの作成も公知の方法が利用できる。

【0058】

【実施例】

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法は特に断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に依った。

【0059】

実施例1. GHS-R発現細胞株の作製とCa上昇活性の測定

GH分泌誘導因子(GHS)がGHSレセプター(GHS-R)に結合することによって生ずる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇(Ca上昇活性)をアッセイするために、以下のようにラットGHS-Rを発現している細胞株を作製した。ラットGHS-Rの全長cDNAは、ラット脳由来のcDNAを鋳型にして、RT-PCR(逆転写酵素—ポリメラーゼチェーンリアクション)によって取得した。公知のラットGHS-Rの塩基配列 [K. McKee, et al. Molecular Endocrinology 11, 415-423 (1997).] から、以下の塩基配列からなるセンスおよびアンチセンスプライマーを合成した。

センスプライマー: 5' -ATGTGGAACGCGACCCCCAGCGA-3'

アンチセンスプライマー: 5' -ACCCCCAATTGTTTCCAGACCCAT-3'

【0060】

増幅されたcDNAをベクターpcDNAIII (Invitrogen社) に繋ぎ、発現ベクターGH-SR-pcDNAIIIを作製した。当該発現ベクターでCHO細胞を形質転換し、GHS-Rを安定に発現している形質転換細胞を $1 \mu\text{g/ml}$ のG418を含有する培地で選択した。選択された細胞株CHO-GHSR62は、 $10^{-10} \sim 10^{-9}$ MのGHRP-6 (Growth Hormone-Releasing hexapeptide) に応答した。細胞内カルシウムイオン濃度の変化(Ca上昇活性)は、FLIPRシステム (Molecular Device社) で測定した。測定前に、 4×10^4

のCHO-GHSR62細胞を壁面が黒い96穴マイクロプレート (Corning社) に傾え、15時間培養した。細胞を4 μ Mの蛍光色素Fluo4 (Molecular Probe社) で1時間保持し、20 mM HEPESと2.5 mM プロベネシドを含むHank's BSSで4回洗浄し、試料を添加して蛍光の変化を測定することによって、Ca上昇活性をアッセイした。

【0061】

実施例2. 内在性GH分泌誘導ペプチドの精製

実施例1に記載したCHO-GHSR62細胞を用いて、ラット由来の各種組織・臓器について、Ca上昇活性を調査した結果、ラット胃由来のペプチド抽出物が0.5 mg相当でも強いCa上昇活性を有することがわかった。そこで、数種類のクロマトグラフィーを用いて、ラット胃抽出物から以下の方法でCa上昇活性を有するペプチドを精製した。

【0062】

新鮮なラットの胃40 gを、混在するプロテアーゼを失活するために、5倍量の沸騰水中で5分間煮沸した。冷却後、煮沸した試料を1M AcOH-20 mM HClに調整し、ポリトロン・ミキサーを用いてペプチドを抽出した。抽出液を11,000 rpm、30分間遠心し、上清をエバポレーターで約40 mlに濃縮した。濃縮液にアセトンを66%になるように添加して、アセトン沈殿を行い、生じた沈殿を除去した後、上清のアセトンを蒸発させた。上清を、0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) で平衡化した10 gのSep-Pak C18 カートリッジ (Waters 社製) に加え、10% CH₃CN/0.1% TFAで洗浄後、60% CH₃CN/0.1% TFAで溶出した。溶出液の溶媒を蒸発後、凍結乾燥を行った。試料を1M AcOHに溶解して、1M AcOHで平衡化したSP-Sephadex C-25 (H⁺型) に吸着させた。1M AcOH、2Mピリジンおよび2M ピリジン-AcOH (pH 5.0) で段階的に溶出することによって、SP-I、SP-IIおよびSP-IIIの3つの画分を、それぞれ得た。SP-III画分をSephadex G-50ゲル濾過カラムに掛け、各々の画分の一部についてCHO-GHSR62細胞を用いたCa上昇活性のアッセイを行った。Sephadex G-50カラムクロマトグラフィーの結果を図1aに示したが、分子量約3,000に相当する活性画分 (図1a中、フラクション43-48) を、TSK CM-2SWカラム (4.6 x 250 mm、Tosoh社製) を用いpH 6.4で、CM-イオン交換によるHPLC (高速液体ク

H 4.8 で二次CM-HPLCで分画した(図10)。活性画分(図1b中、溶出時間55-56分)を、 μ Bondasphere C-18カラム(3.9 x 150 mm、Waters社製)を用いた逆相HPLCで単一にまで精製した。40 gのラットから16 μ gのCa上昇活性を有するペプチドを精製し、グレリン(ghrelin)と命名した。

【0063】

実施例3. グレリンの構造解析

精製したラット由来のグレリンのアミノ酸配列をペプチド・シーケンサー(ABI 494、Applied Biosystems社)で決定した。グレリンは、Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg(Xaaは未同定アミノ酸)の配列からなる28アミノ酸残基で構成されるペプチドであった。XaaはラットcDNAの塩基配列からSerであり、当該ペプチドにおいてはSerが何らかの修飾を受けていることが推定された。そこで、アミノ末端から3番目のセリンが修飾されていない非修飾グレリンをペプチド合成機(ABI 433A、Applied Biosystems社)で化学合成した。非修飾合成グレリンの逆相HPLCでの溶出時間は、天然型グレリンと大きく異なっていた(図2a)ので、非修飾合成グレリンは天然型グレリンよりも著しく親水性であることがわかった。以上の結果から、天然型グレリンのアミノ末端から3番目のセリン(セリン3)は疎水性の残基で修飾されていることがわかった。

【0064】

セリン3の修飾基を明らかにするために、精製したグレリンを電子スプレーイオン化マス分析機(ESI-MS)分析した。観測された天然型グレリンの分子量(3314.9 ± 0.7)は、cDNAの塩基配列から得られた非修飾グレリンペプチドの分子量(3188.5)よりも約126大きかった。以上の結果から、天然型グレリンはセリン3の水酸基がn-オクタノイル(C8:0)脂肪酸で修飾されていると推定された。このことを確認するために、n-オクタノイル(C8:0)グレリンペプチドを化学合成して、逆相HPLCでの溶出時間を調べた。n-オクタノイル(C8:0)ペプチドの化学合成は、セリン3の水酸基以外の全ての官能基を保護したペプチドをペプチド合成機(ABI 433A、Applied Biosystems社)を用いてFmoc固相法で合成し、セリン3

の水酸基を1-(ジメチルアミノ)ピリジンの存在下で、*n*-オクタン酸とエチル-3-*β*-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドでアシル化して合成した。合成した*n*-オクタノイルペプチドは精製した天然型グレリンと同一の溶出時間であった(図2a)。さらに、合成*n*-オクタノイルペプチドおよび天然型グレリンをキモトリプシン処理によって得られる、アミノ末端から4番目までのペプチド断片(Gly 1-Phe 4)は、逆相HPLCで同一の溶出時間を示した。以上の結果から、ラット由来の天然型グレリンは配列番号2に記載のアミノ酸配列を有し、セリン3の水酸基が*n*-オクタン酸(カプリル酸)でアシル化された構造(図2c)であると結論された。

【0065】

また、ヒトグレリンをヒト胃抽出物から精製し、その構造が配列番号3に記載したアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のセリン側鎖の水酸基が*n*-オクタン酸(カプリル酸)でアシル化された構造であるがわかった(図4a)。なお上記ラット及びヒト由来のグレリンの構造は、図1b中の活性画分のうち最初のピーク画分(溶出時間55-56分)精製したものの構造であるが、図1bの他の活性画分についても精製後、上記と同様の方法で構造解析を行った結果、セリン3を修飾している脂肪酸はカプリル酸(C8:0)以外に、カプリル酸のモノエン酸(C8:1)、カプリン酸(C10:0)およびそのモノエン酸(C10:1)、およびラウリル酸(C12:0)およびそのモノエン酸(C12:1)があることがわかった。

【0066】

実施例4. グレリンのCa上昇活性

天然型グレリンおよび*n*-オクタノイル修飾合成グレリンはCa上昇活性を有していたが、非修飾合成グレリンはCa上昇活性を示さなかった(図2b)。また、*n*-オクタン酸または*n*-オクタン酸と非修飾合成グレリンの混合物はCa上昇活性を示さなかったことから、天然型グレリンの*n*-オクタン酸基はCa上昇活性に重要な構造であることがわかった。以後、グレリンとは[0-*n*-オクタノイル-セリン3]-グレリン(図2c)のことを示す。

【0067】

グレリンは、CHO-GHSR62細胞において、GHRP-6よりも高い細胞内カルシウムイ

、図3aではGRF)はCa上昇活性を示さなかった(図3b)。グレリンのCa上昇活性は 10^{-11} Mから認められ、 EC_{50} は2.5nMであった。GHS-Rの特異的アンタゴニストである、[D-Lys 3]-GHRP-6 [R. G. Smith, et al., Science 260, 1640-1643 (1993)] 10^{-4} Mの存在下で、グレリンによるCa上昇活性は抑制され、高濃度のグレリンで、アンタゴニスト非存在下でのCa上昇活性に回復する(図3b)。以上の結果は、グレリンのCa上昇活性がGHS-Rの特異的アンタゴニストによって拮抗的に阻害されることを示している。

【0068】

実施例5. グレリン前駆体cDNAとその各種臓器での発現

グレリンのアミノ酸配列は公知のいかなるペプチドのアミノ酸配列とも相同性を示さなかったが、GenBankデータベースをホモロジー検索したところ、ラットEST (Expressed Sequence Tag) 配列の1つ (GenBank 受理番号A1549172) に同一の配列が認められた。このEST配列を基に以下のPCRプライマーを合成した。

センスプライマー: 5' -TTGAGCCCAGAGCACCAGAAA-3'

アンチセンスプライマー: 5' -AGTTGCAGAGGAGGCAGAAGCT-3'

【0069】

ラット胃由来のcDNAを鋳型に上記の2つプライマーを用いてRT-PCRを行った。PCRの条件は、1サイクルが98℃で10秒間、55℃で30秒間、72℃で1分間を、35サイクル行った。増幅されたDNA断片をプローブとして、ラット胃cDNAライブラリーをスクリーニングした。約 2×10^5 の組換えファージをスクリーニングして、ラット由来グレリンをコードする全長cDNAを取得した。

【0070】

ラットグレリンcDNAは、配列番号6に記載した501塩基からなり、117アミノ酸(図4a)からなるグレリン前駆体(prepro-ghrelin)をコードしていた。グレリン前駆体のアミノ末端の23アミノ酸残基はシグナルペプチドの性質を備えていた。グレリンはグリシン24から始まり、成熟型グレリンの最後の2つのアミノ酸(Pro-Arg)は、プロテアーゼによる切断を受ける配列であった。

【0071】

【0072】

グレリンの組織間分布を知るために、ラットの種々の組織から単離されたpoly(A)⁺RNAを解析した (図4b)。ラット組織のノザンプロット解析によって、0.62 kbのグレリン前駆体mRNAが胃に認められた。心室 (Ventricle) にも2本のかすかなバンドが認められたが、これらは6.2 kbおよび1.2 kbのmRNAで、胃でのmRNAよりも大きく、胃とは異なったmRNAのスプライシングが推定された。以上の結果からグレリン主な発現部位は胃であることがわかった。

【0073】

実施例6. グレリンの下垂体ホルモン分泌への効果

グレリンがGH分泌誘導活性を有しているかをin vitroおよびin vivoで調べた。まずin vitroでのアッセイとして、下垂体前葉の初期培養細胞へのグレリンの効果を調べた。4週令の雄SDラットから下垂体前葉を採取し、コラゲナーゼ処理で分散させた後、細胞を集め、10%FCS (ウシ胎児血清) と抗生物質を含むDMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) 培地で2回洗浄し、DMEM培地に懸濁して、下垂体前葉初期培養細胞を調製した。5 x 10⁴ の細胞を、ポリ-D-リジンでコートした96穴の細胞培養プレートに植え、3~4日培養した。培養液を0.1 mlの試料を含有するDMEM培地と交換し、37℃で15分間保持した。培養液の一部を採取して、ラジオイムノアッセイによって、培養液中の各種下垂体ホルモンの濃度を測定した。下垂体ホルモンのうち、GH、FSH、LH、PRL、TSHはBiotrak/Amersham社製のキットを用い、ACTHはPeninsula Laboratories社製の高感度EIAキットを用いた。

グレリンを下垂体前葉初期培養細胞に添加すると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が認められ、非修飾合成グレリンでも弱いながらもCa上昇活性が認められた(図5a)。この結果は、グレリン及び非修飾合成グレリンが下垂体細胞に直接作用することを示している。次に、下垂体前葉初期培養細胞を用いてグレリンがGH分泌誘導活性を調べたところ、 10^{-6} Mのグレリンの添加により、培養液中のGH濃度だけが濃度依存的に増加し、他の下垂体ホルモン(FSH、LH、PRL、TSH)の濃度増加は認められなかった(図5b)。

【0075】

グレリンのGH分泌誘導活性をin vivoで調べた。合成グレリン10 μ gを雄ラット(250 g)の静脈に注射後、60分まで経時的に血液を採取して、血漿中の下垂体ホルモンの濃度を上記ラジオイムノアッセイによって測定した。下垂体ホルモンの内、GHだけが血液中に放出され、グレリンの静脈注射後5~10分で最高値に達した。この結果から、胃から血液中に放出されたグレリンが下垂体前葉細胞に作用し、血液中にGHを放出することがわかり、グレリンが未同定だった特異的な内在性GH分泌誘導物質であることが確認された。

【0076】

実施例7. ラットでの心拍出量増加

麻酔下ラットを用いて心血管系に及ぼすグレリン急性投与の効果を調べた。体重220-250gのWistar系雄性ラット(ケアリー)を用い、心血管系に及ぼすグレリン急性投与の効果を検討するためラットを無作為に4群(10, 1, 0.5, 0.2 μ g投与群)に分けた。グレリンは生理食塩水で希釈し、ラット1匹あたりの投与量を、10, 1, 0.5, 0.2 μ gに調整して、心拍出量測定のため右総頸静脈に挿入したインジェクションチューブ(PE50)から120 μ l急性投与した。

【0077】

動力学的指標として全身血圧、心拍出量を測定し、さらに末梢血管抵抗値を算出した。ラットをベントバルビタールで麻酔後、背位に固定した。平均血圧測定のために、右大腿動脈にヘパリンで満たしたポリエチレンカニューレ(PE50)を挿入した。心拍出量の測定は熱希釈式心拍出量計(CARDIOTHER M500R)を用いて

【0078】

【表 1】

	体重 (g)	グレリン 1 μ g 投与後の心拍出量 (ml/min/kg)				
		0分	1分	5分	15分	30分
平均	230	347	382	367	341	338
SEM	3.7	14.3	10.2	11.5	7.9	8.8

【表 2】

	体重 (g)	グレリン 10 μ g 投与後の心拍出量 (ml/min/kg)				
		0分	1分	5分	15分	30分
平均	237	350	390	392	370	344
SEM	1.0	8.5	7.4	15.8	14.7	13.8

グレリン 1 μ g 投与群 (表 1) 及びグレリン 10 μ g 投与群 (表 2) おいて、投与後 1 分及び 5 分で、心拍出量の増加が認められた。

【0079】

【発明の効果】

本発明の新ペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩は、人又は動物に投与することによって GH の分泌を誘導し、実質的な副作用を伴うことなく、小児

その抗体はGH欠乏により疾病の診断にさらには学術分野の研究ツールとして優れた作用効果を奏する。

【 0 0 8 0 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kangawa, Kenji

<120> New Peptides

<130>

<160> 7

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213>

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro

1

5

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<223> Amino acid sequence for rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>2

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Amino acid sequence for human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>3

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys

1

5

10

15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

<210> 4

<211> 117

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<223> Amino acid sequence for a prepro-form of rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>4

Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu

1

5

10

15

Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His

20

25

30

Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu

35

40

45

Ala Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe
 50 55 60
 65 70 75 80
 Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg
 85 90 95
 Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu
 100 105 110
 Ala Pro Ala Asn Lys
 115

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Amino acid sequence for prepro-form of human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>5

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
 1 5 10 15
 Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
 20 25 30
 Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
 35 40 45
 Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln
 50 55 60
 Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe
 65 70 75 80
 Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu

100

105

110

Ala Pro Ala Asp Lys

115

<210> 6

<211> 501

<212> cDNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (31).... (381)

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rat endogenous peptide
s of growth hormone secretagogue

<400>6

tccagatcat ctgtcctcac caccaaggcc atg gtg tct tca gcg act 48

Met Val Ser Ser Ala Thr

1

5

atc tgc agt ttg cta ctc ctc agc atg ctc tgg atg gac atg gcc atg 96

Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu Trp Met Asp Met Ala Met

10

15

20

gca ggt tcc agc ttc ttg agc cca gag cac cag aaa gcc cag cag aga 144

Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg

25

30

35

aag gaa tcc aag aag cca cca gct aaa ctg cag cca cga gct ctg gaa 192

Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu Glu

40

45

50

ggc tgg ctc cac cca gag gac aga gga caa gca gaa gag gca gag gag 240

gag ctg gaa atc agg ttc aat gct ccc ttc gat gtt ggc atc aag ctg 288
 Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu
 75 80 85
 tca gga gct cag tac cag cag cat ggc cgg gcc ctg gga aag ttt ctt 336
 Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala Leu Gly Lys Phe Leu
 90 95 100
 cag gat atc ctc tgg gaa gag gtc aaa gag gcg cca gct aac aag 381
 Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala Pro Ala Asn Lys
 105 110 115
 taaccactga caggactggt ccctgtactt tcctcctaag caagaactca catccagctt 441
 ctgcctcctc tgcaactccc agcactctcc tgctgactta caaataaatg ttcaagctgt 501

<210> 7

<211> 511

<212> DNA

<220>

<221> CDS

<222> (34).... (385)

<213> Homo sapiens

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rat endogenous peptide
 s of growth hormone secretagogue

<400>7

gcaggccac ctgtctgcaa ccagctgag gcc atg ccc tcc cca 45
 Met Pro Ser Pro

1

ggg acc gtc tgc agc ctc ctg ctc ctc ggc atg ctc tgg ctg gac ttg 93
 Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu Trp Leu Asp Leu

Printed: 02-08-2002 PRIODOC-X 00946433-JP000450

5 10 15 20

g c c a t g g c a g g c t c c a g c t t c c t g a g t c c t g a a c a c c a g a g a g t c c a g 141

Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln

25 30 35

c a g a g a a a g g a g t c g a a g a a g c c a c c a g c c a a g c t g c a g c c c c g a g c t 189

Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala

40 45 50

c t a g c a g g c t g g c t c c g c c g g a a g a t g g a g g t c a a g c a g a a g g g g c a 237

Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala Glu Gly Ala

55 60 65

g a g g a t g a a c t g g a a g t c c g g t t c a a c g c c c c t t t g a t g t t g g a a t c 285

Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile

70 75 80

a a g c t g t c a g g g g t t c a g t a c c a g c a g c a c a g c c a g g c c t g g g g a a g 333

Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala Leu Gly Lys

85 90 95 100

t t t c t t c a g g a c a t c c t c t g g g a a g a g g c c a a a g a g g c c c a g c c g a c 381

Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp

105 110 115

a a g t g a t c g c c c a c a a g c c t t a c t c a c c t c t c t c t a a g t t t a g a a g c g c t c a t 434

Lys

c t g g c t t t t c g c t t g c t t c t g c a g c a a c t c c c a c g a c t g t t g t a c a a g c t c a g g a g g c g a 494

a t a a a t g t t c a a a c t g t 511

【0081】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図1は、グレリンのラット胃抽出物からの精製を示す図で、CH0-

黒棒で示してある。aは、40 g ラット由来より調製したSP-III画分のSephadex G-50

(fine) によるゲル濾過の結果を示す図で、活性画分が分子量約3,000ダルトンであることを示している。bは、2回目のCM-イオン交換HPLCの結果を示す図で、55?56分に溶出される活性画分は、逆相HPLCでさらに精製した。

【図 2】 図2は、グレリンにおける η -オクタノイル修飾を同定したことを示す。aは、天然型グレリン（上段）、及び合成グレリンと合成脱アシル化グレリン（下段）、各々2 μ gを逆相HPLCで分析した結果を示す図である。bは、天然型グレリン（実線）、合成グレリン（小破線）及び合成脱アシル化グレリン（大破線）による、CHO-GHSR62細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示す図である。

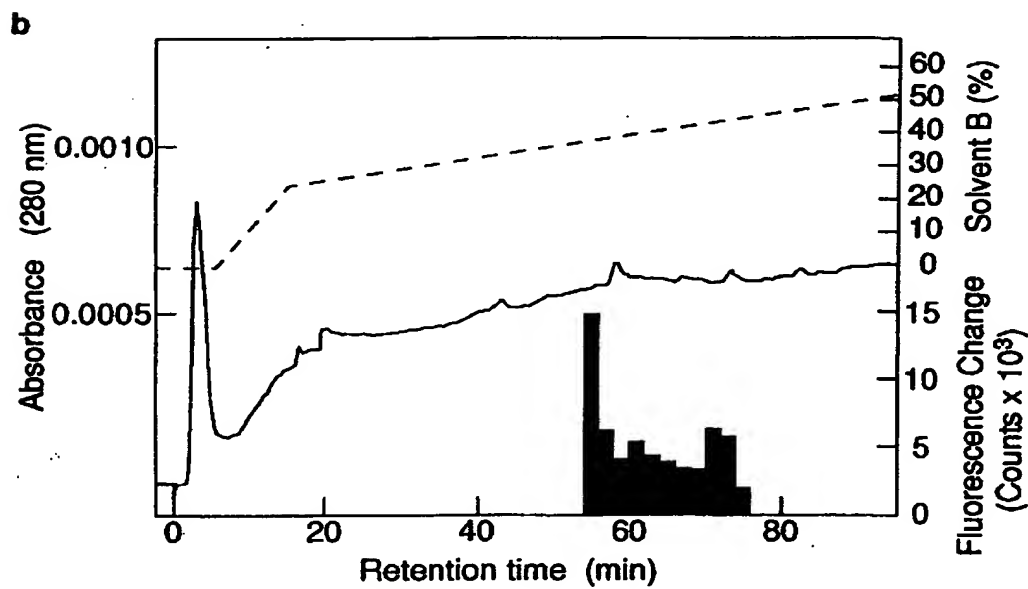
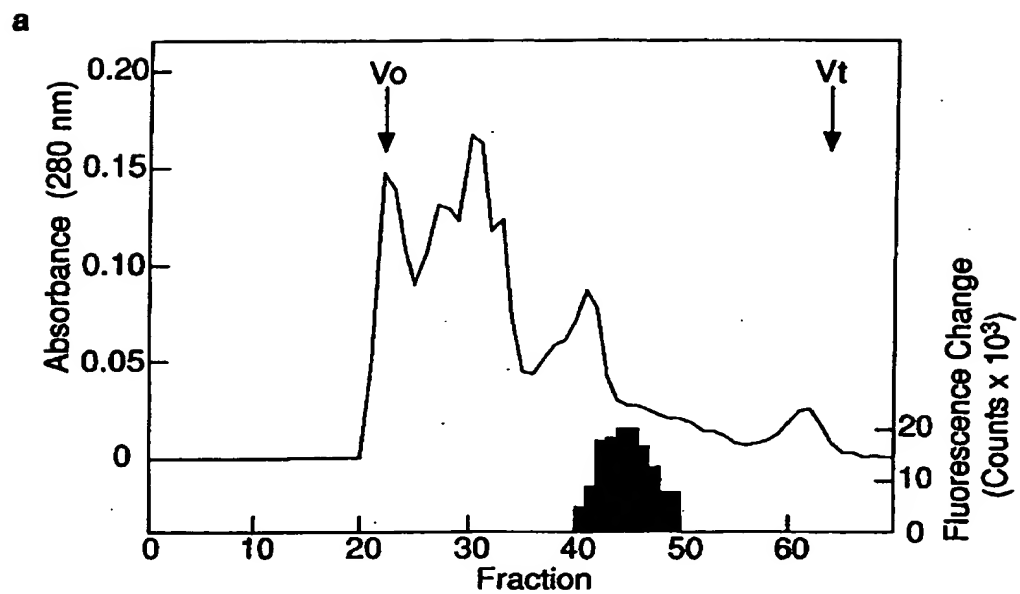
【図 3】 図3は、グレリンのCHO-GHSR62細胞に対する特異的な相互作用を示す図で、図中、矢印で示した点で試料を添加した。aは、グレリン、GHRP-6およびGRF（GHRH）によるCHO-GHSR62細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示した図である。bは、GHS-Rの特異的阻害剤である[D-Lys-3]-GRP-6を添加（○）あるいは非添加（●）時の、グレリンによるCHO-GHSR62細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示した図で、GRF（GHRH）による細胞内カルシウムイオン濃度の変化（黒三角）も示してある。

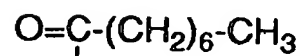
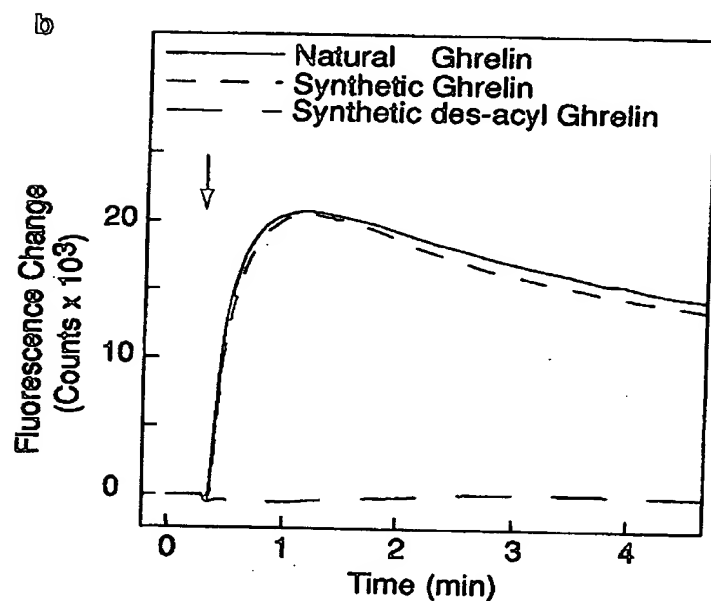
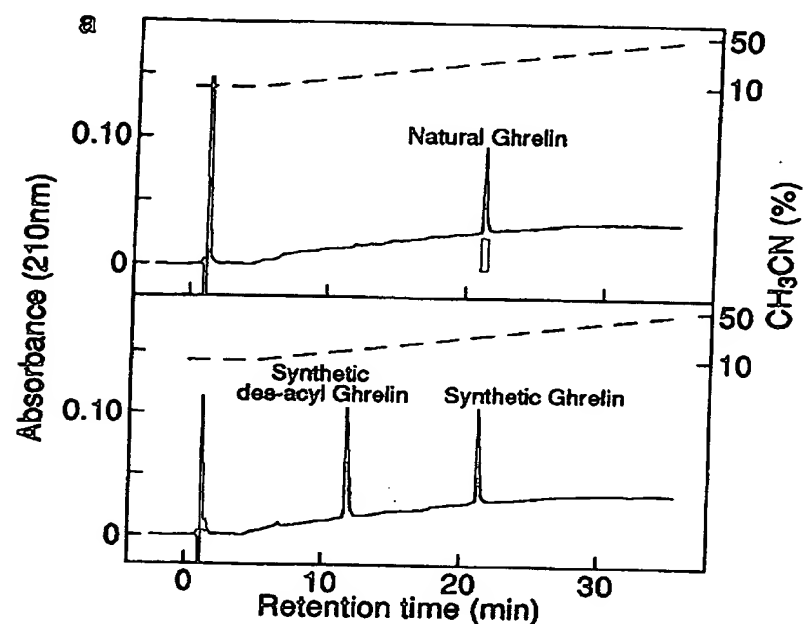
【図 4】 図4は、ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列、およびこれら前駆体の各種組織での発現を調べた結果を示す図である。aは、ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列を比較した図で、図中、同一アミノ酸は網掛け、点線はシグナルペプチド、黒三角はシグナルペプチドの切断点、三角はカルボキシル末端側の切断点、ボックスは成熟型グレリン部分、*は η -オクタン酸による修飾を示す。bは、ラット各種組織におけるグレリンの発現をノザンプロットによって解析した結果を示す図である。

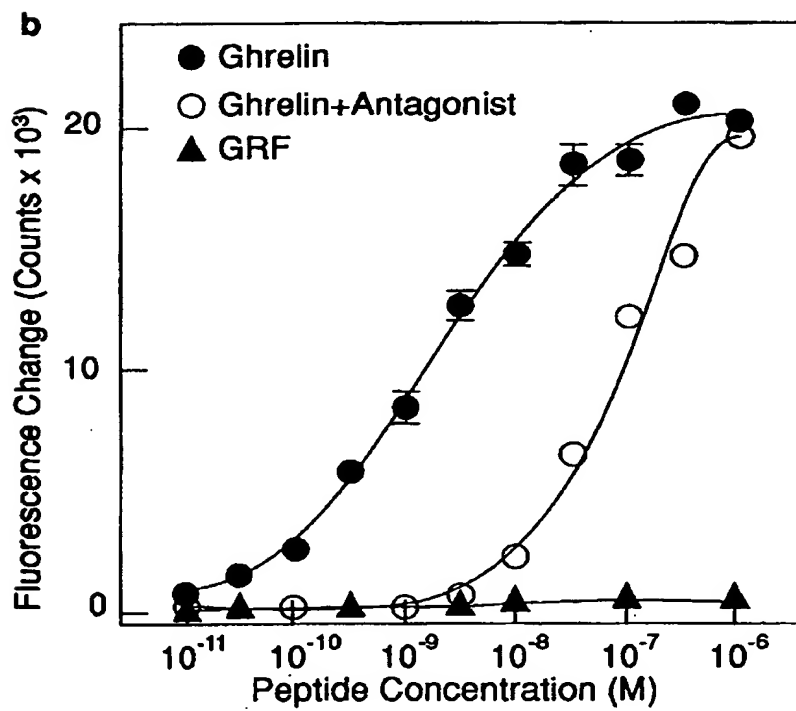
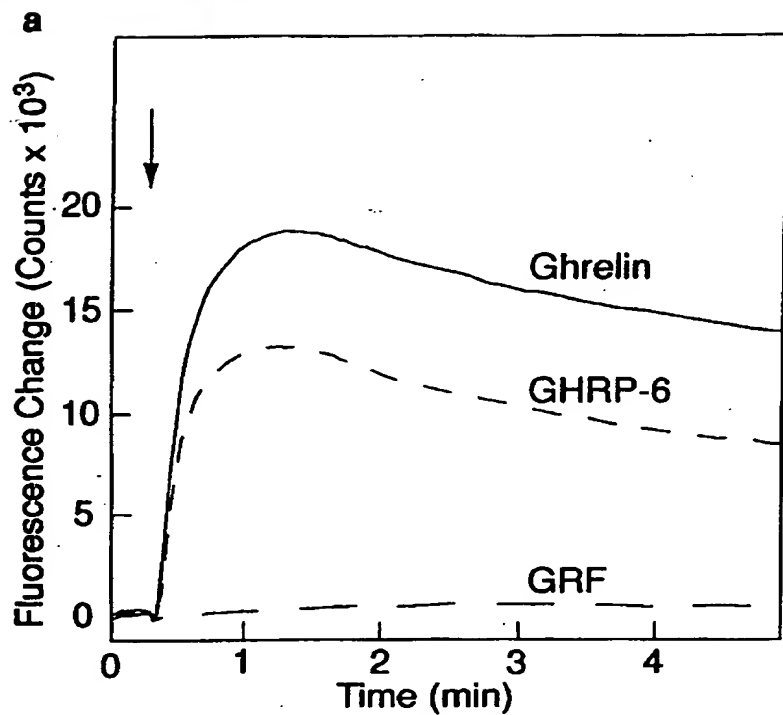
【図 5】 図5は、in vitroおよびin vivoにおけるグレリンの下垂体ホルモン分泌に及ぼす効果を示す図である。aは、ラット下垂体初期培養細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化による蛍光強度の変化を示した図で、実線はグレリン、破線は脱アシル化グレリンを添加した場合を示す。bは、グレリン

による下垂体ホルモンの分泌を示す図で、図中、黒棒はグレリン添加時、白棒は
Printed: 02-03-2002 PRIODOC-X 002/6453-JP000496
グレリン非添加時の下垂体ホルモン濃度を示す。cは、雄ラットにグレリンを静

脈注射した後の血漿中の下垂体ホルモン濃度の経時変化を示す図である。図bお
よび図c中で、GHは成長ホルモン、ACTHはアドレノコルティコトロピン、FSHはフ
ォリクル、LHはルテナイジングホルモン、PRLはプロラクチン、TSHはチロイド促
進ホルモン



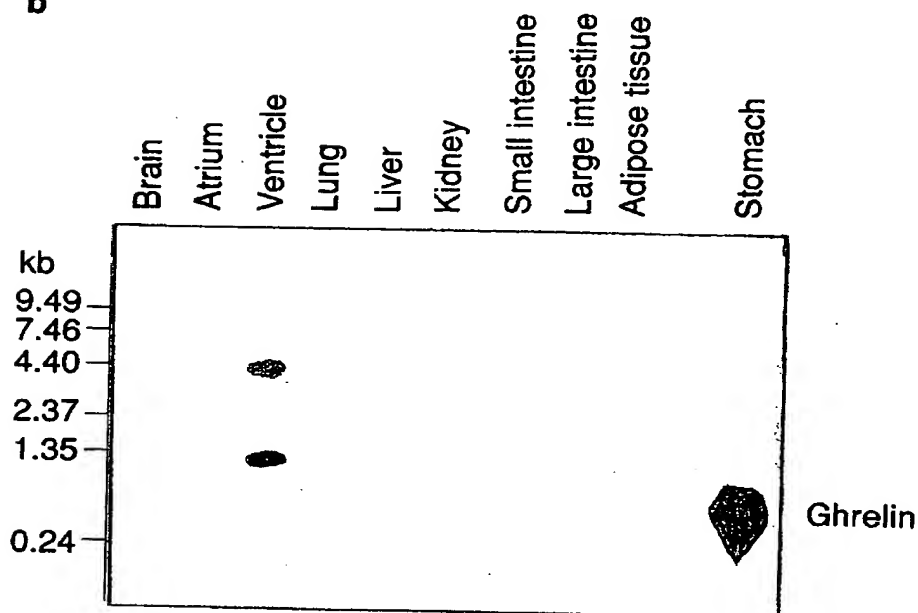


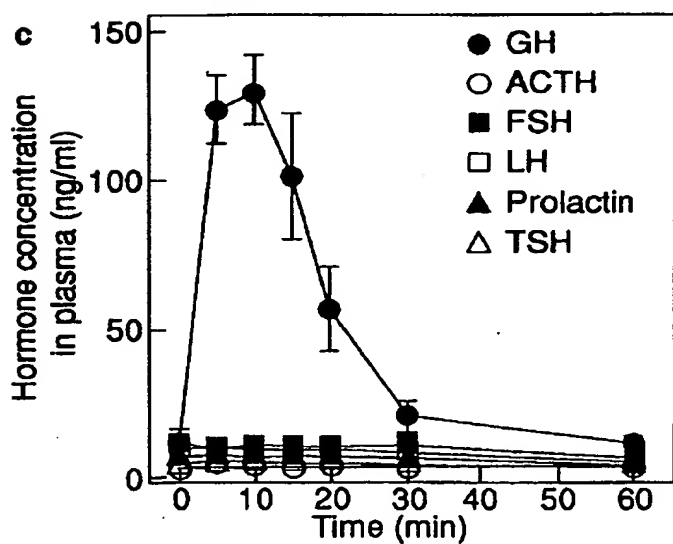
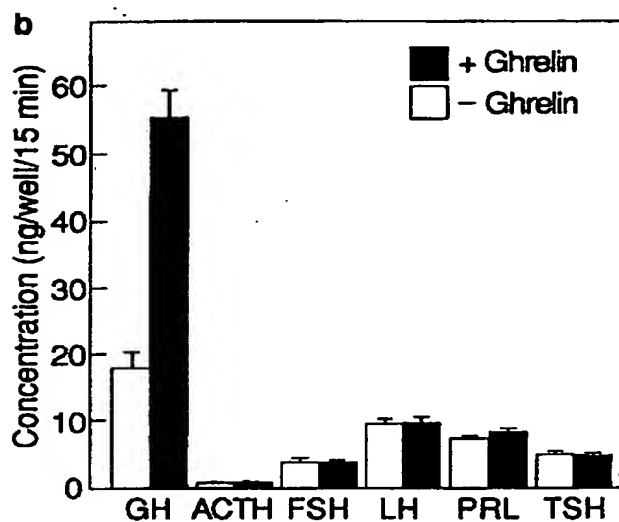
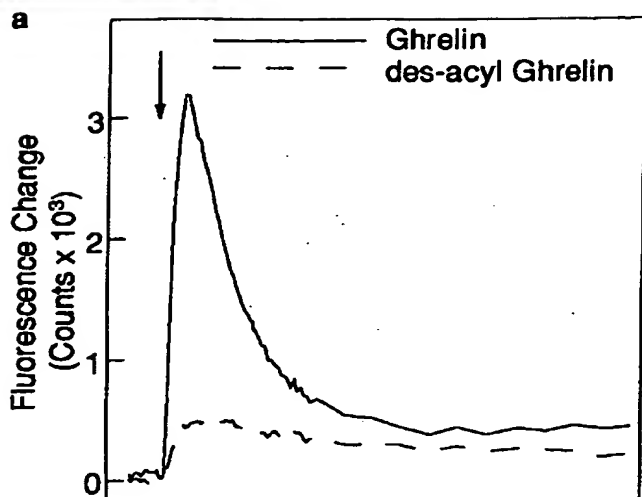


a

Human	1	MPSPGTVCSLLLLGMLWDLAMAGSSFLSP	30
Rat	1	MVSSATICSLLLLLSMLWMDMAMAGSSFLSP	30
Human	31	EHQRVQORKE SKKPPAKLOPRALAGWLRPE	60
Rat	31	EHQKAQORKE SKKPPAKLOPRALEGWLHPE	60
Human	61	DGGQAE GA EDELEVRFNAPFDVGIKLSGVQ	90
Rat	61	DRGQAEEAEEEELEIRFNAPFDVGIKLSGAQ	90
Human	91	YQQHSQALGKFLQDILWEEAKEAPADK	117
Rat	91	YQQHGRALGKFLQDILWEEVKEAPANK	117

b





THIS PAGE BLANK (USPTO)

【要 約】

【課 題】 成長ホルモン分泌を誘導する新規ペプチド系化合物を提供する。

【解決手段】 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくとも一つのアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【選択図】 なし

5 9 9 1 0 4 0 9 3

19990723

新規登録

5 9 3 0 8 1 4 7 5

大阪府箕面市小野原東 6 丁目 2 8 、 4 - 2 0 1 号

寒川 賢治

5 9 9 1 0 4 0 9 3

19990806

識別番号の統合による抹消

5 9 3 0 8 1 4 7 5

大阪府箕面市小野原東 6 丁目 2 8 、 4 - 2 0 1 号

寒川 賢治

5 9 3 0 8 1 4 7 5

19990806

識別番号の二重登録による統合

5 9 9 1 0 4 0 9 3

大阪府箕面市小野原東 6 丁目 2 8 、 4 - 2 0 1 号

寒川 賢治

5 9 3 0 8 1 4 7 5

19990806

住所変更

5 9 9 1 0 4 0 9 3

大阪府箕面市小野原東 6 丁目 2 8 、 4 - 2 0 1 号

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)